دانشگاه تبریز

دانشکده کشاورزی

گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد

عنوان

تولید نانوسلولز از کرک پنبه و کاربرد آن به عنوان محافظ سرمایی برای افزایش زنده‌مانی لاکتوباسیل‌ها طی خشک کردن انجمادی

استادان راهنما

دکتر رضا رضایی مکرم

دکتر محمد امین حجازی

استادان مشاور

دکتر بابک قنبرزاده

دکتر محمود صوتی خیابانی

پژوهشگر

فاطمه کیوانی نهر

بسم الله الرحمن الرحیم

چکیده

به دلیل اهمیت باکتری‌های اسید لاکتیک در صنایع تخمیری و تولید محصولات پروبیوتیکی، تولید کشت‌های آماده برای تلقیح مستقیم از نظر تکنولوژیکی و تجارت بین‌الملل دارای اهمیت ویژه‌ای است. خشک کردن انجمادی در مقایسه با سایر روش‌های خشک کردن دارای مزایایی مانند حفظ خصوصیات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری، فراهم کردن نرخ زنده‌مانی بالاتر و حفظ بهتر فعالیت متابولیسمی سلول است. اصلی‌ترین علت افت زنده‌مانی سلول‌ها در این روش آسیب‌های ناشی از انجماد بر سلول‌ها است. برای جلوگیری از آسیب به سلول‌ها در مرحله‌ی انجماد می‌توان از مواد محافظ در محیط آنها استفاده کرد. این مواد با تشکیل فاز شیشه‌ای در اطراف سلول‌ها باعث افزایش زنده‌مانی آنها در حین فرآیند می‌شوند. در این پژوهش ویژگی محافظت کنندگی نانوفیبر سلولز با محافظت کننده‌های معمول شامل ترهالوز و شیر پس‌چرخ مقایسه شده است. اسید لاکتیک باکتری‌های بومی جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی به عنوان سلول‌های هدف انتخاب شدند. برای بهینه سازی اثر فاکتورها بر افزایش زنده‌مانی از طرح آماری روش سطح پاسخ استفاده شد. طرح مرکب مرکزی برای دستیابی به غلظت بهینه مواد محافظ جهت حصول بالاترین زنده‌مانی به کار برده شد. با آنالیز نمودارهای سطح پاسخ غلظت بهینه مواد محافظ به صورت ۱۳/۷۵٪ شیر پس‌چرخ، ۲۰/۵٪ ترهالوز و ۱۳/۷۵٪ نانوسلولز به دست آمد.

کلید واژه‌ها: نانوسلولز، محافظت کننده‌ها، اسیدلاکتیک باکتری‌ها، خشک‌کردن انجمادی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست شکل‌ها ..... ث
فهرست جدول‌ها ..... ح
فصل اول: مروری بر تحقیقات اخیر ۱
۱-۱ مقدمه ۲
۱-۲ نگهداری میکروارگانیسم‌ها از طریق خشک کردن ۳
۱-۳ مراحل خشک کردن میکروارگانیسم‌ها ۳
۱-۳-۱ فاز رشد و غلظت سلولی ٤
۱-۳-۲ محیط رشد ٦
۱-۳-۳ مقاومت به خشک شدن ۷
۱-۳-٤ عوامل محافظت کننده ۷
۱-۳-۵ روش خشک کردن ۹
۱-۳-٦ هیدراتاسیون مجدد ۱۱
۱-۳-۷ نگهداری و بسته‌بندی ۱۲
۱-٤ خشک کردن انجمادی ۱٤
۱-۵ مواد محافظت کننده و مکانیسم عمل آن‌ها ۱۵
۱-٦ نانوفیبر سلولز ۱۸
۱-۷ مروری بر تحقیقات اخیر ۲۰
فصل دوم: مواد وروش‌ها ۲٤
۲-۱ مواد مورد استفاده ۲٤
۲-۲ آزمایش‌ها ۲٤
۲-۳ طرح آماری آزمایش‌ها ۲٤
۲-٤ مواد مورد استفاده ۲۵
۲-٤-۱ مواد شیمیایی ۲۵
۲-٤-۲ محیط کشت ۲۵
۲-٤-۳ گونه‌های باکتریایی ۲۵
۲-٤-٤ تجهیزات آزمایشگاه ۲۵

۲-۵ آزمایش‌ها ۲۶
۲-۵-۱ تولید نانوسلولز ۲۶
۲-۵-۲ تعیین اندازه‌ی ذرات سلولز ۲۷
۲-۵-۳ اعمال تیمارها و خشک کردن توده سلولی ۲۹
۲-۶ طرح آماری آزمایش‌ها ۳۱
فصل سوم: نتایج و بحث ۳۴
۳-۱ نتایج بررسی مشخصات نانو فیبر سلولز تولید شده ۳۵
۳-۱-۱ مرفولوژی و ساختار نانو فیبر سلولز تولید شده ۳۵
۳-۱-۲ نتایج آزمون پراش اشعه ایکس ۳۶
۳-۱-۳ نتایج تصویر تهیه شده توسط ریز نگاره نیروی اتمی ۳۸
۳-۱-۴ نتایج تصویر تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره ۳۸
۳-۲ نتایج بهینه‌سازی غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز بر اساس میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بعد از انجماد ۳۹
۳-۲-۱ اعتبار سنجی مدل‌های پیش‌بینی شده برای نمونه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بعد از انجماد ۴۵
۳-۳ نتایج بهینه‌سازی غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز بر اساس میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بعد خشک کردن به روش انجمادی ۴۶
۳-۳-۱ اعتبار سنجی مدل‌های پیش‌بینی شده برای نمونه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بعد از خشک کردن انجمادی ۵۳
۳-۴ نتایج بهینه‌سازی غلظت شیر پس‌چرخ بر اساس میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس برویس* بعد از انجماد ۵۴
۳-۴-۱ اعتبار سنجی مدل‌های پیش‌بینی شده برای نمونه‌های *لاکتوباسیلوس برویس* بعد از انجماد ۶۰
۳-۵ نتایج بهینه‌سازی غلظت شیر پس‌چرخ بر اساس میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس برویس* بعد از خشک شدن انجمادی ۶۱
۳-۵-۱ اعتبار سنجی مدل‌های پیش‌بینی شده برای نمونه‌های *لاکتوباسیلوس برویس* بعد از خشک کردن انجمادی ۶۷
۳-۶ بررسی نتایج بهینه‌سازی تیمارهای مواد محافظ انجمادی بر اساس میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* منجمد شده در مقایسه با سلول‌های خشک شده به روش انجمادی ۶۸

۳-۷ بررسی نتایج بهینه‌سازی تیمارهای مواد محافظ انجمادی بر اساس میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس برویس* منجمد شده در مقایسه با سلول‌های خشک شده به روش انجمادی ۶۹
بخش چهارم: نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۷۰

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱: مراحل اصلی آبگیری میکروارگانیسم‌ها و اهمیت عوامل بحرانی در هر مرحله. مراحل داخل خط‌چینها اختیاری هستند و عوامل بحرانی در مستطیل‌هایی با زوایای دایره‌ای نشان داده شده‌اند (فو و چن، ۲۰۰٦).....
٤
شکل ۱-۲: مراحل رشد باکتری‌ها طی کشت در فرمانتور ناپیوسته ۵
شکل ۱-۳: قفسه‌های خشک‌کن انجمادی ۱۳
شکل ۱-٤: مکانیسم محافظتی قندها (سانتیوارانگ کنا، ۲۰۰۸).....۱۷
شکل ۱-۵: مکانیسم محافظتی قندها (سانتیوارانگ کنا، ۲۰۰۸).....۱۸
شکل ۳-۱: ذرات سلولز تیمار نشده در آب.....۳۵
شکل ۳-۲: سوسپانسیون نانو ذرات سلولز بعد از تیمار شیمیایی و فیزیکی ۳٦
شکل ۳-۳: نتایج آزمون پراش اشعه ایکس.....۳۷
شکل ۳-٤: تصویر تهیه شده توسط ریز نگاره نیروی اتمی ۳۸
شکل ۳-۵: تصویر تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره ۳۹
شکل ۳-٦: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ (SM) و ترهالوز (TH) بر روی میانگین میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بعد از انجماد. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد $CFU/ml \times ۱۰^{۹}$ آورده شده است. ٤۳
شکل ۳-۷: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ (SM) و نانوسلولز (NC) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بعد از انجماد. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد $CFU/ml \times ۱۰^{۹}$ آورده شده است. ٤٤
شکل ۳-۸: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت ترهالوز (TH) و نانوسلولز(NC) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بعد از انجماد. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد $CFU/ml \times ۱۰^{۹}$ آورده شده است. ٤۵
شکل ۳-۹: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ (NC) و ترهالوز (TH) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بعد خشک کردن انجمادی. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد $CFU/ml \times ۱۰^{۹}$ آورده شده است. ۵۱
شکل ۳-۱۰: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ (SM) و نانوسلولز (NC) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بعد خشک کردن انجمادی. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد $CFU/ml \times ۱۰^{۹}$ آورده شده است ۵۲

شکل ۳-۱۱: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت ترهالوز (TH) و نانوسلولز (NC) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بعد خشک کردن انجمادی. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد CFU/ml $۱۰^{۹}$× آورده شده است.....۵۳

شکل ۳-۱۲: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ (SM) و ترهالوز (TH) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از انجماد. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد CFU/ml $۱۰^{۹}$× آورده شده است. ۵۸

شکل ۳-۱۳: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ (SM) و نانوسلولز (NC) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از انجماد. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد CFU/ml $۱۰^{۹}$× آورده شده است. ۵۹

شکل ۳-۱٤: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت ترهالوز (TH) و نانوسلولز (NC) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از انجماد. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد CFU/ml $۱۰^{۹}$× آورده شده است. ٦۰

شکل ۳-۱۵: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ (SM) و ترهالوز (TH) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن انجمادی. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد CFU/ml $۱۰^{۹}$× آورده شده است. ٦۵

شکل ۳-۱٦: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ (SM) و نانوسلولز (NC) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن انجمادی. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد CFU/ml $۱۰^{۹}$× آورده شده است. ٦٦

شکل ۳-۱۷: نمودار سطح پاسخ تأثیر غلظت ترهالوز (TH) و نانوسلولز(NC) بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از خشک شدن انجمادی. پاسخ به صورت میانگین سلول‌های زنده شمارش شده در واحد CFU/ml $۱۰^{۹}$× آورده شده است. ٦۷

فهرست جدول‌ها

جدول ۲-۱: متغیر های اصلی در پنج سطح جهت تعیین میزان پاسخ ۳۲
جدول ۲-۲: طرح مرکب مرکزی برای تعیین غلظت بهینه مواد محافظ برای دستیابی به بالاترین زنده‌مانی ۳۲
جدول ۳-۱: نمایش تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بعد از انجماد در فریزر $-80^{o}C$ (اعداد به صورت میانگین آورده شده‌اند)....۴۰
جدول ۳-۲: نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز بر روی میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بعد از دو ساعت انجماد در فریزر $-80^{o}C$.....۴۱
جدول ۳-۳: اعتبار سنجی مدل پیش‌بینی شده برای نمونه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم بعد از انجماد..۴۶
جدول ۳-۴: نمایش تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز بر روی میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* خشک شده به روش انجمادی (اعداد به صورت میانگین آورده شده‌اند).....۴۷
جدول ۳-۵: نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بعد از خشک کردن به روش انجمادی ۴۸
جدول ۳-۶: اعتبار سنجی مدل پیش‌بینی شده برای نمونه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* خشک شده به روش انجمادی .....
۵۴
جدول ۳-۷: نمایش تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز بر روی میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس برویس* منجمد شده (اعداد به صورت میانگین آورده شده‌اند).....۵۵
جدول ۳-۸: نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از دو ساعت انجماد در فریزر $-80^{o}C$ ۵۶
جدول ۳-۹: اعتبار سنجی مدل پیش‌بینی شده برای نمونه‌های لاکتوباسیلوس برویس منجمد شده.....۶۱
جدول ۳-۱۰: نمایش تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز بر روی میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس برویس* خشک شده به روش انجمادی (اعداد به صورت میانگین آورده شده‌اند). ۶۲
جدول ۳-۱۱: نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر غلظت شیر پس‌چرخ، ترهالوز و نانوسلولز بر روی میزان زنده‌مانی لاکتوباسیلوس برویس بعد از دو ساعت انجماد در فریزر $-80^{o}C$ ۶۳
جدول ۳-۱۲: اعتبار-سنجی مدل پیش‌بینی شده برای نمونه‌های لاکتوباسیلوس برویس خشک شده به روش انجمادی ۶۸

فصل اول:

مروری بر تحقیقات اخیر

۱-۱ مقدمه

۱-۲ نگهداری میکروارگانیسم‌ها از طریق خشک‌کردن

۱-۳ مراحل خشک‌کردن میکروارگانیسم‌ها

۱-٤ خشک‌کردن میکروارگانیسم‌ها

۱-۵ مواد محافظت‌کننده و مکانیسم عمل آن‌ها

۱-٦ نانوفیبر سلولز

۱-۱ مقدمه

اسید لاکتیک باکتری‌ها به عنوان نگهدارنده‌های زیستی طبیعی[1] در غذاهای تخمیری استفاده می‌شوند. همچنین گروهی از این باکتری‌ها اثرات سودمندی بر سلامت میزبان دارند که پروبیوتیک نامیده می‌شوند. برای مثال *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* قادر به جذب مؤثر آفلاتوکسین B_1 است. افزایش تقاضا برای پروبیوتیک‌ها، صنعت را برای تولید مقادیر بالایی از کشت‌های پروبیوتیک به چالش کشیده است. کشت‌های پروبیوتیک خشک، رایج‌ترین فرم صنعتی باکتری‌ها و دارای مزایایی از قبیل سهولت استفاده، فرآیند کردن و حمل‌ونقل هستند (مولر،۲۰۰۷ و النظامی، ۱۹۹۸).

میکروارگانیسم‌های خشک شده که دارای فعالیت بیولوژیکی هستند، کاربردهای صنعتی گسترده و ارزش تجاری بین‌المللی بالایی دارند. کشت خشک شده در مقایسه با کشت مایع، مزیت‌هایی مانند سهولت حمل‌ونقل و کنترل بهتر کیفیت را داراست. میکرب‌های خشک شده بر اساس فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف خود، می‌توانند برای تولید محصولات زیر، به کار روند:

۱. قرص‌ها یا کپسول‌های خوراکی حاوی باکتری‌های مفید برای بهبود سلامتی مانند پروبیوتیک‌ها
۲. استفاده به عنوان محیط‌کشت آغازگر[2] در صنایع لبنی مانند مخمرهای کفیر و سایر اسیدلاکتیک باکتری‌ها
۳. مکمل‌های کاربردی[3] در محصولات غذایی مانند مخمر آبجو و یوکاریوت‌های تولیدکننده‌ی باکتریوسین
٤. عوامل کنترل زیستی[4] مانند آفت‌کش‌ها و نگهدارنده‌های زیستی از قبیل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (فو و چن،۲۰۰٦).

زمانی که از خشک کردن انجمادی یا لیوفیلیزاسیون در مورد میکروارگانیسم‌ها صحبت می‌شود، معمولاً نگهداری طولانی مدت سوسپانسیون‌های سلولی حاوی 10^8 CFU/ml یا بیشتر مد نظر است. علت استفاده از غلظت بالای سلولی این است که بیشتر سلول‌ها در طول مدت نگهداری از بین می‌روند، ولی با این روش تعداد کافی[5] زنده خواهند ماند (مورگان، ۲۰۰٦). در مقایسه با تکنولوژی‌های مرسوم، مزایای

[1] Natural biopreservative
[2] Starter culture
[3] Functional supplements
[4] Bio control agents
[5] Sufficient number

کلیدی خشک کردن انجمادی عبارتند از: حفظ خصوصیات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی، سطوح فعالیت و دوام و بازده بالا. ولی هزینه‌ی سرمایه‌گذاری و نگهداری و مصرف انرژی این روش بالاتر است (هارنکارنسوجاریتا، ۲۰۱۲).

فیبرهای سلولز دسته‌هایی از میکروفیبریل‌ها بوده که در آن مولکول‌های سلولز به صورت طولی توسط پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های هیدروکسیلی خود به هم وصل شده‌اند. میکروفیبریل‌ها شامل نواحی تک کریستالی سلولز بوده که به نواحی آمورف متصل شده‌اند. هر فیبریل ۱۰-۵ نانومتر قطر و طولی در حدود چند صد نانومتر تا چندین میکرومتر دارد. در حین هیدرولیز اسیدی، میکروفیبریل‌ها متحمل شکستگی در نواحی آمورف شده و سلولز کریستالی یا رشته‌ها رها می‌شوند. به دلیل دارا بودن آرایش کریستالی، رشته‌های سلولز مدول بالایی دارند و به عنوان مواد تقویت کننده به کار می‌روند (اوکسمن، ۲۰۰۶).

۱-۲ نگهداری میکروارگانیسم‌ها از طریق خشک کردن

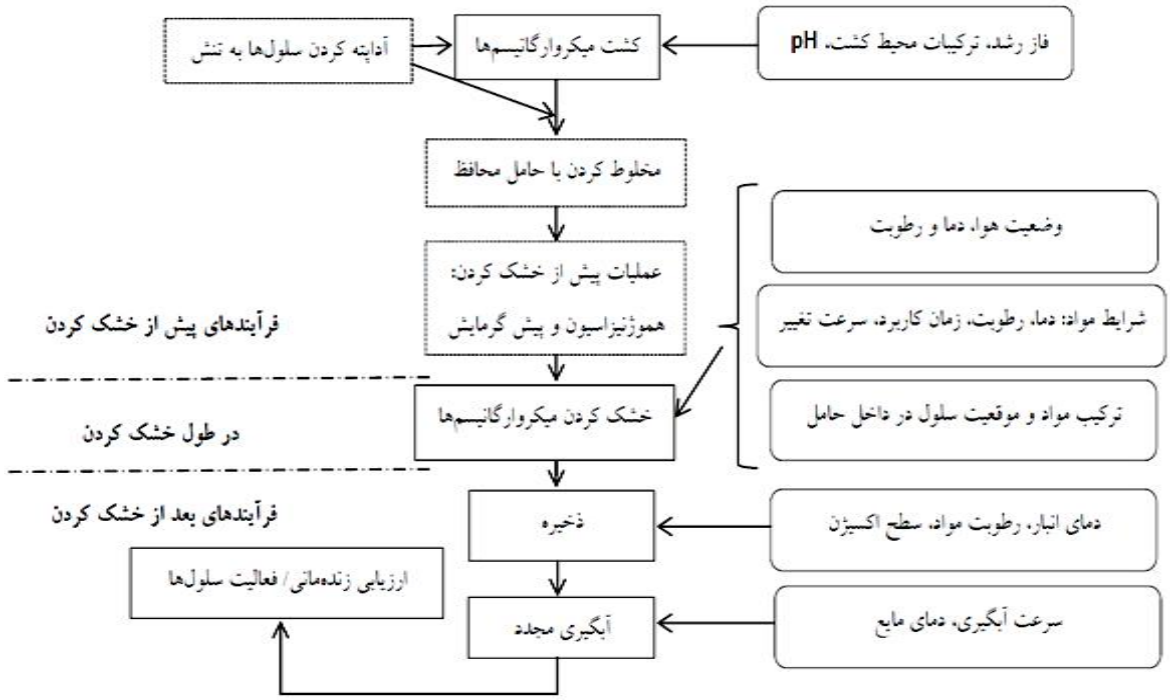
خشک کردن سلول‌ها، برای نگهداری آنها در دمای محیط انجام می‌گیرد. به علت هزینه بالای نگهداری سرد یا منجمد، کاهش دما همیشه برای نگهداری طولانی مدت مناسب نیست. نگهداری میکروارگانیسم‌ها از طریق هیدراتاسیون، برای نگهداری طولانی مدت بر سایر روش‌ها ترجیح داده شده است. با وجود کاربرد وسیع فن‌آوری‌های خشک کردن و ظهور روش‌های مختلف خشک کردن میکروارگانیسم‌ها، هنوز هیچ روش عمومی برای همه‌ی کاربردها، ارائه نشده است. میکروارگانیسم‌ها را می‌توان از طریق خشک کردن انجمادی، تشکیل کف و خشک کردن پاششی، خشک نمود (مورگان، ۲۰۰۶).

۱-۳ مراحل خشک کردن میکروارگانیسم‌ها

هدف هر فرآیند خشک کردن، ایجاد قابلیت نگهداری طولانی مدت میکروارگانیسم بدون کاهش در زنده‌مانی سلول‌ها است. بیشتر تحقیقات انجام شده، شمارش سلولی را بلافاصله بعد از فرآیند در نظر گرفته‌اند، چون زمان طولانی برای بررسی افت زنده‌مانی در شرایط نگهداری لازم است. برای دستیابی به بالاترین نرخ زنده‌مانی سلول‌های خشک شده، بهینه‌سازی تمام مراحل فرآیند دارای اهمیت است. مراحل

بررسی شده شامل فاز رشد میکروارگانیسم و غلظت سلولی، شرایط رشد، مقاومت به خشک شدن، عوامل محافظت کننده، روش خشک کردن، هیدراتاسیون مجدد، نگهداری و بسته‌بندی خواهند بود.

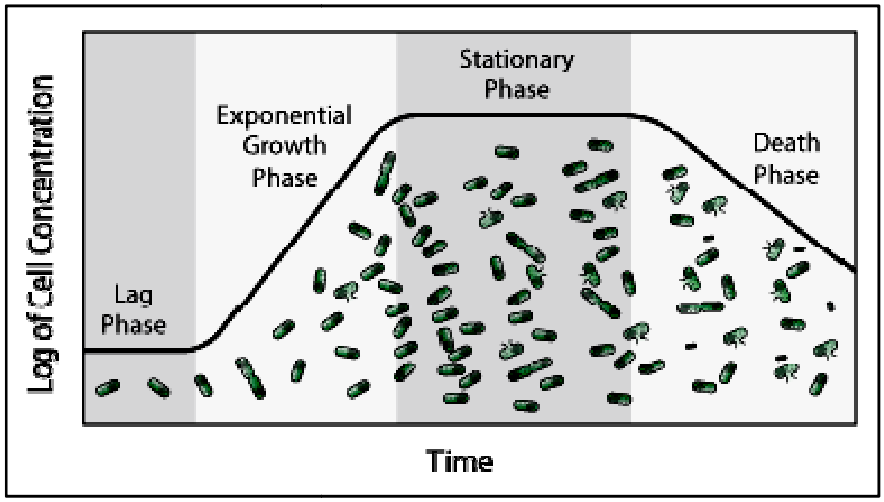
شکل ۱-۱ مراحل مختلف خشک‌کردن میکروارگانیسم‌ها و تأثیر شرایط بحرانی در هر مرحله را بر زنده‌مانی سلول‌ها، نشان می‌دهد.



شکل ۱-۱: مراحل اصلی آبگیری میکروارگانیسم‌ها و اهمیت عوامل بحرانی در هر مرحله. مراحل داخل خطچین‌ها اختیاری هستند و عوامل بحرانی در مستطیل‌هایی با زوایای دایره‌ای نشان داده شده‌اند (فو و چن، ۲۰۰۶).

۱-۳-۱ فاز رشد و غلظت سلولی

رشد باکتری‌ها دارای چهار مرحله‌ی مجزا است: فاز تأخیر، فاز رشد لگاریتمی، فاز سکون و فاز مرگ. مراحل رشد سلول‌ها را طی کشت در شکل ۱-۲ نشان داده شده‌اند.



شکل ۱-۲: مراحل رشد باکتری‌ها طی کشت در فرمانتور ناپیوسته

فاز سکون شامل حالت‌های فیزیولوژیکی متعددی در داخل سلول‌ها است که باعث ایجاد پاسخ‌های استرس خواهند شد و زنده‌مانی جمعیت سلولی را فراهم خواهد کرد. همچنین این پاسخ موجب محافظت از سلول‌ها در سایر شرایط نامناسب مانند خشک‌کردن و دمای نامطلوب نیز می‌گردد.

فاز رشد بهینه برای زنده‌مانی در طول خشک شدن به ارگانیسم بستگی دارد. برای مثال سلول‌های فاز سکون *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بیشترین زنده‌مانی را بعد از فرآیند نشان می‌دهد (۵۰-۳۱٪) و سلول‌های فاز کمون با ۲٪ زنده‌مانی، بالاترین حساسیت را نشان می‌دهند (کورکوران، ۲۰۰٤). بر خلاف آن در مورد سلول‌های *سینوریزوبیوم* و *برادی‌ریزوبیوم* زنده‌مانی بالاتر در فاز کمون مشاهده شده است (بوماهدی، ۱۹۹۹).

مقالات کمی در مورد غلظت سلولی بهینه برای خشک کردن انجمادی وجود دارند. باور بر این است که هر چه غلظت سلولی اولیه بالاتر باشد، سلول‌های زنده به مدت طولانی‌تری در نمونه‌های خشک شده به روش انجمادی، باقی خواهند ماند. اگر چه کوستا و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که غلظت سلولی اولیه‌ی بهینه، به محیط محافظ مورد استفاده بستگی دارد. هنگام به کار بردن ساکارز برای دستیابی به بالاترین بازیابی سلولی، غلظت اولیه‌ی 10^{10} CFU/ml بهینه است. در حالی که هنگام استفاده از شیر پس‌چرخ فاقد چربی به عنوان محیط محافظ، غلظت اولیه‌ی 10^{8} CFU/ml بالاترین بازیافت سلول‌های خشک شده به روش انجمادی را در بر داشت.

پالم فلدت و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که یک همبستگی بین غلظت سلولی و محیط محافظ وجود دارد. غلظت سلولی اولیه‌ی مورد نیاز برای بازیافت بهینه‌ی خشک کردن انجمادی، با افزایش غلظت ساکارز مورد استفاده در محیط محافظ، کاهش یافت.

۱-۳-۲ محیط رشد

تا چندی پیش چنین تصور می‌شد که محیط رشد هیچ تأثیری بر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها طی خشک کردن ندارد. بیشتر مطالعات به اثر افزودنی‌های محافظ و فاز رشد بر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها تأکید داشته‌اند تا محتوای محیط رشد. اخیراً دو مطالعه نشان دادند که محیط رشد می‌تواند اثر مهمی بر زنده‌مانی *انتروکوکوس فاسیلوس*، *انتروکوکوس دورانس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* طی خشک کردن انجمادی داشته باشد. همچنین این مطالعات به اثر نوع گونه و مواد محافظ تأکید کرده‌اند (کاروالهو، ۲۰۰۳و-۲۰۰٤b).

استریتر و همکاران (۲۰۰۳) تحقیقی روی *برادی ریزوبیوم ژاپنیکوم*[1] انجام دادند که نشان داد حضور ترهالوز در زمان رشد، در محافظت از سلول در مقابل خشک شدن، مؤثرتر از زمانی بود که در حین خشک شدن به محیط سلول اضافه می‌شد. افزودن ترهالوز به محیط کشت سبب افزایش مقدار ترهالوز در داخل سیتوپلاسم می‌شود که غشای سیتوپلاسمی را در طول خشک کردن پایدار می‌کند. ذخیره سازی ترهالوز یا هر کربوهیدرات دیگر در فضای بین سلولی، زمانی ممکن خواهد بود که میکروارگانیسم نتواند از کربوهیدرات موجود به عنوان منبع کربوهیدراتی استفاده کند یا این که توانایی قرار دادن آنزیم‌های تجزیه کننده کربوهیدرات را در داخل واکوئل‌ها داشته باشد.

میکروارگانیسم‌ها در حین فرآیند خشک شدن با کاهش فعالیت آبی متحمل تنش اسمزی می‌شوند. برخی محلول‌ها مانند پلی‌اول‌ها، اسیدهای آمینه و مشتقات آمینی، پروتئین‌ها و غشای سلولی را در شرایط تنش اسمزی پایدار می‌کنند. ارگانیسم می‌تواند با استفاده از این محلول‌ها تعادل اسمزی را بین محیط خارج سلولی بسیار تغلیظ شده و محیط رقیق داخل سلول، حفظ کند. همچنین این محلول‌ها می‌توانند به پایداری پروتئین‌ها و غشای سلولی در شرایط تنش اسمزی حاصل از کاهش فعالیت آبی در طول فرآیند کمک کند (مورگان، ۲۰۰٦).

[1] *Bradyrhizobiom japonicum*

۱-۳-۳ مقاومت به خشک شدن

باور بر این است که شرایط تنش‌زای خاصی در زمان رشد میکروارگانیسم می‌توانند موجب ایجاد پاسخ‌های مقاومتی شوند. استریت و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که کاهش pH به ۵/۱۵ در زمان رشد *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* باعث افزایش تحمل سلول‌ها به انجماد می‌شود. این نتایج موافق با یافته‌های پالم فلدت و هان هنگلدال (۲۰۰۰) در مورد *لاکتوباسیلوس رئوتری* بود. همچنین کمبود کربن و کاهش pH می‌تواند موجب تولید ژن‌هایی شود که پروتئین‌های تنش[1] را کُد خواهند کرد. اگر چه کاهش pH در زمان رشد می‌تواند سبب ایجاد تغییر در ترکیب اسیدچرب‌های غشا شود و پروتئین‌های شوک اسیدی[2] را تولید نماید.

تولید پروتئین‌های تنش در مرحله‌ی رشد موجب می‌شود که سلول‌ها بدون نیاز به تولید پروتئین‌های جدید بعد از فرآیند خشک کردن، قادر به اصلاح آسیب‌های وارده به سلول باشند (مورگان، ۲۰۰۶).

۱-۳-٤ عوامل محافظت کننده

عوامل محافظت کننده می‌توانند در طول رشد میکروارگانیسم، قبل از فرآیند انجماد یا خشک شدن و یا در طول انجماد یا خشک شدن به محیط اضافه شوند. این عوامل شامل مواد جامد شیر فاقد چربی، ترهالوز، گلیسرول، بتائین، آدونیتول، ساکارز، گلوکز، لاکتوز و پلیمرهایی مانند دکستران و پلی‌اتیلن‌گلیکول هستند. افزودنی‌های محافظت کننده می‌توانند به دو دسته تقسیم بندی شوند: مواد تشکیل دهنده‌ی حالت شیشه‌ای آمورف و نمک‌های اوتکتیک کریستاله (مورگان، ۲۰۰۶).

مورد اول شامل موادی همچون کربوهیدرات‌ها، پلیمرها و پروتئین‌ها است. شیشه یک مایع فوق اشباع با ویسکوزیته‌ی بسیار بالا است که از نظر ترمودینامیکی ناپایدار است. افزودنی‌های تشکیل دهنده‌ی فاز شیشه‌ای، بالاترین محافظت را در طول خشک شدن انجمادی فراهم می‌کنند. تشکیل حالت شیشه‌ای، ویسکوزیته‌ی کافی را در داخل و اطراف سلول‌ها ایجاد می‌کند که تحرک مولکولی را به حداقل می‌رساند. همچنین قادر است محصولات زائد آزاد شده از سلول‌ها را قبل از انجماد در داخل خود نگه دارد، در نتیجه از تغلیظ آن‌ها و تغییرات الکتروشیمیایی غشای پلاسمایی در طول نگهداری جلوگیری نماید.

[1] Stress protein
[2] Acid shock protein

نمک اوتکتیک یک نمک کریستالی است که با رسیدن به نقطه‌ی انجماد محلول را ترک می‌کند و ساختار کریستالی را تشکیل می‌دهد. هر محلول در یک دمای خاص کریستاله می‌شود. تشکیل کریستال‌های مضر (نمک یا یخ) می‌تواند به غشای سلولی آسیب بزند و در نتیجه باعث خروج محتویات سلول بعد از انجمادزدایی گردد. با رسیدن به نقطه‌ی انجماد آب، کریستال‌های یخ تشکیل می‌شوند و نمک باقی مانده در محلول تغلیظ شده و با محتویات خروجی از سلول مخلوط می‌شود. این مواد می‌توانند موجب ایجاد آسیب‌های غیرقابل برگشت غشای سلولی شوند. چنین به نظر می‌آید که نمک‌های اوتکتیک به جای اثر محافظتی، دارای تأثیرات مضر هستند. مقالات کمی درباره‌ی استفاده از نمک‌های اوتکتیک به عنوان عامل محافظ در خشک کردن میکروارگانیسم‌ها وجود دارد. با این حال عجیب است که هنوز این نمک‌ها در برخی از فرآیندهای خشک کردن انجمادی به ویژه در کاربردهای غیربیولوژیکی و صنایع داروسازی به کار می‌روند. اما داشتن درک کافی از نقش این نمک‌ها در محیط سلول ضروری است چون نمک‌های الکترولیت هم مورد نیاز باکتری‌ها هستند و هم در طول رشد از سلول‌ها می‌شوند، پس همیشه در محیط کشت وجود خواهند داشت (مورگان، ۲۰۰۶).

قندهایی مانند ترهالوز و ساکارز با جایگزینی آب در اطراف باقی مانده‌های قطبی در داخل ساختارهای ماکرومولکولی، سبب پایدارسازی پروتئین‌های غشا می‌شوند. این دی‌ساکاریدها در طول خشک کردن با تشکیل پیوندهای هیدروژنی و ممانعت از دناتوراسیون، از ساختار و عملکرد پروتئین‌ها محافظت می‌کنند که به حفظ ساختار سوم پروتئین در غیاب آب کمک می‌کند (مورگان، ۲۰۰۶).

اگرچه باور بر این است که قندها ترکیبات اصلی مؤثر بر تشکیل شیشه هستند، نشان داده شده است که پلی‌پپتیدها نیز می‌توانند ویژگی‌های شیشه‌ای قندها را تغییر دهند. بویتینک و همکاران (۲۰۰۰) دریافتند که در دماهای بالاتر از T_g[1]، پروتئین‌ها پایدارتر از قندها هستند. پس پروتئین‌ها بیشتر از قندها در تشکیل شیشه نقش دارند. این نکته می‌تواند علت محافظت خوب پودر شیر پس‌چرخ و سرم را توضیح دهد.

بنابراین چنین به نظر می‌رسد که مخلوط پروتئین‌ها و قندها، محافظت کننده‌های مؤثرتری خواهند بود.

[1] Glass transition temperature (T_g)

۱-۳-۵ روش خشک کردن

خشک کردن انجمادی از چندین دهه‌ی قبل برای نگهداری میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود و روشی است که برای تهیه‌ی مجموعه‌های میکربی بر سایر روش‌ها ارجحیت دارد. کلکسیون‌های میکربی مانند ATCC[1] و NCTC[2] از این روش استفاده می‌کنند. کاربرد و حمل و نقل مواد خشک شده به روش انجمادی بسیار آسان است. در این بخش روش‌های مختلف خشک کردن و مزایا و معایب آن‌ها را بررسی شده است.

تشکیل کف یک تکنیک جدید خشک کردن است که از بافت قندی محافظ جهت انتقال سوسپانسیون‌های بیولوژیکی به کف‌های خشک پایدار از نظر ترمودینامیکی، استفاده می‌کند. این کف‌ها با جوشاندن تحت خلاء در دمای محیط به وجود می‌آیند و تحت فرآیند شیشه‌ای شدن نسبی[3] قرار می‌گیرند که کف‌های شیشه‌ای غیرکریستالی، آمورف بدون تحرک را مستقیماً از یک مایع ایجاد می‌کند. سپس کف‌ها با افزایش دما مجدداً خشک می‌شوند تا پایداریشان در دما افزایش یابد.

این فرآیند نیاز به انجماد را از بین می‌برد و در نتیجه از صدمات آن نیز ممانعت خواهد شد. گزارش شده است که خشک کردن با کف باعث پایدارسازی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه‌ی *کرموریس* و گونه‌های گرم مثبت نظیر *اشریشیاکلای* در دماهای بالاتر از ۳۷°C با ٤٠٪ افت در زنده‌مانی شده است (مورگان، ۲۰۰٦).

خشک کردن پاششی یک فرآیند مهم در صنعت لبنیات است و می‌تواند مقادیر بالایی از ترکیبات لبنی را با قیمت نسبتاً پایین در مقایسه با خشک کردن انجمادی تولید نماید. خشک کردن پاششی با اتمیزه کردن محصول مرطوب با سرعت بالا در یک محفظه، پودرهای گرانوله‌ی خشک را از یک محلول آبکی[4] تولید می‌کند. دمای هوای داخل محفظه ۲۰۰°C است. سپس قطرات اتمیزه شده قبل از برخورد با دیواره‌های محفظه به شکل گرانولی خشک می‌شوند. این فرآیند در تولید محصولاتی مانند پلیمرها، سورفکتانت‌ها، نمک‌های غیرآلی، رنگدانه‌ها، شیر، آب پنیر و پودر ذرت به کار می‌رود. تحقیقات اخیر امکان استفاده از این روش را برای خشک کردن باکتری های پروبیوتیک بررسی کرده‌اند. برای دستیابی به عمر انبارمانی طولانی محصولات خشک شده با این روش باید دمای نگهداری، رطوبت نسبی محیط

[1] American Type Culture Collection (ATCC)
[2] National Collection of Type Culture (NCTC)
[3] Vitrification
[4] Slurry

نگهداری و حضور اکسیژن تحت کنترل باشند. به دلیل هزینه‌ی بالای نگهداری سرد یا منجمد، کاهش دما همیشه روش مناسبی برای نگهداری طولانی مدت نیست. روش‌های بسته‌بندی مانند بسته‌بندی تحت خلاء یا نیتروژن نیز ممکن است بسیار هزینه‌بر باشند (مورگان، ۲۰۰۶).

در تحقیقی بازیابی سه گونه‌ی اسیدلاکتیک باکتری تولید کننده‌ی باکتریوسین که با روش خشک کردن پاششی، خشک شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. فقط یکی از سه گونه‌ی باکتریایی پس از سه ماه انبارمانی زنده مانده بود و این بیانگر این مطلب است که این روش برای تمام گونه‌ها مناسب نیست. این محققین دریافتند که تغییرات نسبتاً کوچک در دمای خروجی، اثرات مهمی بر زنده‌مانی گونه‌های *لاکتوباسیلوس* داشت، بنابراین دمای خشک کن پاششی باید برای هر کاربرد جدید به صورت مجزا بهینه‌سازی شود (سیلوا،۲۰۰۲).

لارنا و همکاران (۲۰۰۳) اثر سه روش خشک کردن را بر زنده‌مانی *پنی‌سیلیوم اگزالیکوم*[1] مقایسه کردند: خشک کردن انجمادی، خشک کردن پاششی و خشک کردن در بستر سیال.

خشک کردن بستر سیال روشی برای خشک کردن مواد جامد گرانولی است و برای خشک کردن محصولات مایع به کار نمی‌رود. یکی از مزایای این روش این است با به‌کارگیری یک اسپری در داخل خشک‌کن بستر سیال می‌تواند مواد را روی محصولات گرانولی پوشش دهد. مشابه خشک کن پاششی، خشک کن بستر سیال در صنعت به صورت گسترده برای تولید قهوه، غذای کودک، پلیمرها، غنی‌کننده‌ها[2]و دترجنت‌ها به کار می‌رود. این روش در مقایسه با خشک‌کردن انجمادی، زنده‌مانی پایین‌تری را برای سلول‌های *انتروکوکوس فاسیوم* فراهم می‌کند. در حالی‌که در صورت پیش‌تیمار با مواد محافظ غشای سلولی مانند شیر پس‌چرخ و ساکارز، خشک‌کن بستر سیال تأثیر کمتری روی غشای سلول‌ها در مقایسه با روش خشک‌کردن انجمادی خواهد گذاشت و آسیب‌های غشای سلولی بعد از دو ماه نگهداری کمتر خواهد بود (استامر، ۲۰۱۲).

لارنا و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که خشک‌کردن بستر سیال می‌تواند موجب زنده‌مانی ۱۰۰٪ اسپور *پنی‌سیلیوم اگزالیکوم* گردد. اسپور خشک شده به روش انجمادی، برای حفظ زنده‌مانی بعد از فرآیند، نیاز به یک ماده‌ی محافظ دارد. خشک کن پاششی سلول‌هایی با ۲۰٪ زنده‌مانی تولید می‌کند که احتمالاً به دلیل کاربرد دماهای بالاتر از $80^{o}C$ در خروجی آن است.

[1] *Penicillium oxalicum*
[2] Fertilizer

با وجود مزایایی که خشک کردن در بستر سیال نسبت به خشک کردن پاششی و خشک کردن انجمادی دارد، هنوز به صورت گسترده برای خشک کردن میکروارگانیسم‌ها استفاده نمی‌شود.

اگر چه خشک کردن انجمادی متداول‌ترین روش خشک کردن میکروارگانیسم‌ها است، افت زنده‌مانی در آن وجود دارد. انجماد اصلی‌ترین عامل ایجاد آسیب به سلول‌ها است. دو روش برای انجماد نمونه وجود دارد:

- انجماد در داخل محفظه‌ی خشک کن انجمادی از طریق قفسه‌های سرد
- انجماد محصول قبل از بارگذاری در محفظه‌ی خشک کن انجمادی

روش اول تشکیل آهسته‌ی ساختار کریستالی یکنواخت یخ را امکان‌پذیر می‌کند. تشکیل کریستال‌های بزرگ یخ موجب شکستن غشای سلولی می‌شود که نمی‌تواند پس از خشک شدن ترمیم گردد و سبب کاهش زنده‌مانی خواهد شد. برای تشکیل کریستال‌های یخ ریزتر، انجماد سریع بهتر است که نیاز به انجماد قبل از قرار گرفتن در خشک کن انجمادی را دارد. در این صورت اطمینان از باقی ماندن شکل منجمد در طول انتقال و بارگیری به داخل خشک کن انجمادی ضروری است.

خشک کردن انجمادی در نتیجه‌ی تصعید کریستال‌های یخ به بخار، در دما و فشار کمتر از نقطه سه‌گانه‌ی[1] آب، انجام می‌شود. ساختار مواد جامد خشک شده به روش انجمادی به ویژگی‌های ماده مانند T_g بستگی دارد. کریستال‌های کوچک یخ تشکیل شده در دماهای پایین در برابر جریان بخار به هنگام تصعید، مقاومت ایجاد می‌کنند و واپاشی ساختاری را به همراه دارند (مورگان، ۲۰۰۶).

۱-۳-۶ هیدراتاسیون مجدد

هیدراتاسیون مجدد میکروارگانیسم‌های خشک شده، آخرین مرحله‌ی بحرانی برای زنده‌مانی آن‌ها بعد از فرآیند خشک کردن است. دامنه‌ی گسترده‌ای از محیط‌ها برای هیدراتاسیون مجدد وجود دارد. محیط‌های مخلوطی مانند محلول ۱۰٪ شیر پس‌چرخ بدون چربی، محیط PTM (۱/۵٪ پپتون، ۱٪ تریپتون و ۰/۵٪ عصاره‌ی گوشت) و محلول ۱۰٪ ساکارز بازیابی سلولی بالاتری نسبت به محیط بافر فسفات، سدیم گلوتامات و آب فراهم می‌کنند (کوستا، ۲۰۰۰). رای و همکاران (۱۹۷۱) دریافتند که استفاده از یک سیال هیدراتاسیون مجدد که فشار اسمزی بالایی نسبت به سلول‌های خشک شده به روش انجمادی دارد، باعث کنترل بیشتر فرآیند می‌شود. کوستا و همکاران (۲۰۰۰) یک محیط کمپلکس

[1] Triple point